

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **08-163986**
(43)Date of publication of application : **25.06.1996**

(51)Int.Cl. C12N 15/09
 C12Q 1/04
 C12Q 1/68
 // C12N 1/21
 (C12N 15/09
 C12R 1:19)
 (C12Q 1/68
 C12R 1:19)
 (C12N 1/21
 C12R 1:19)

(21)Application number : **06-312261** (71)Applicant : **RES DEV CORP OF JAPAN**
 IMAMOTO FUMIO
 TAKARA SHUZO CO LTD
 FURUSAWA MITSURU
 FUJITSU LTD

(22)Date of filing : **15.12.1994** (72)Inventor : **IMAMOTO FUMIO**
 ISHINO YOSHIZUMI
 FURUSAWA MITSURU
 DOI HIROFUMI

(54) DNA REPLICATION MODEL IN ESCHERICHIA COLI**(57)Abstract:**

PURPOSE: To obtain a DNA replication model having such function that a recombinant plasmid with a reporter gene connected to is transfected into a mismatched base calibration factor-deleted host bacterium and the difference of the mutation incidence for the reporter gene in its replication is detected as the character difference for the host bacterium.

CONSTITUTION: A recombinant plasmid prepared by connecting a reporter gene such as a mutant gene of a drug-resistant gene to a plasmid where a DNA replication is advanced in one-way fashion from a replication starting point is transfected into a mismatched base calibration factor-deleted host bacterium such as KH (1379CdnaQ49), recA+ strain of Escherichia coli KH1380 having a mutation in DNA polymerase IIIε factor, and the difference of the mutation incidence for the reporter gene in the respective replication of the double- stranded DNA of the recombinant plasmid is detected as the character difference for the host bacterium, thus obtaining the objective DNA replication model intended to examine whether mutation incidence frequency differ between the

discontinuous and continuous replications of a genome DNA to certify the mutational disequilibrium theory.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 06.12.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

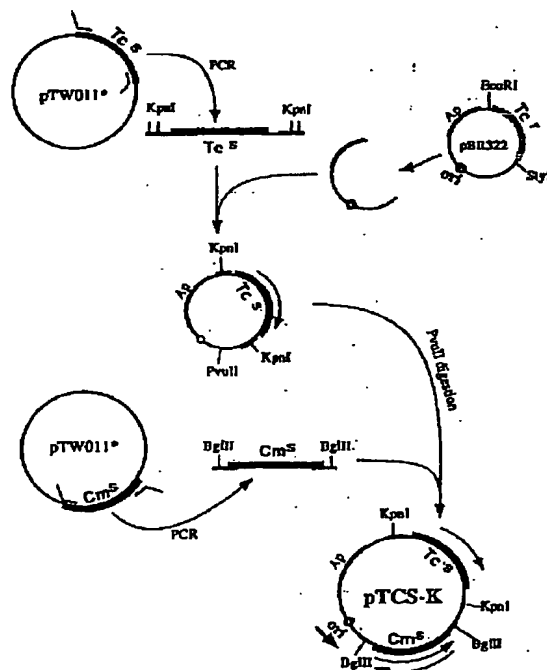
Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(11)特許出願公開番号

(43)公開日 平成8年(1996)6月25日

審査請求 未請求 請求項の数 3 OL (全 5 頁) 最終頁に続く

(74) 代理人 弁理士 西澤 利夫



【特許請求の範囲】

【請求項1】 DNA複製が複製起点から一方向に進行するプラスミドにレポーター遺伝子を接続した組換え体プラスミドを、ミスマッチ塩基の校正因子を欠く宿主菌に導入し、組換え体プラスミドの2本鎖DNAの各々の複製時に生じるレポーター遺伝子の変異発生率の差を、宿主菌の形質の相違として検出することを特徴とする大腸菌におけるDNA複製モデル。

【請求項2】 レポーター遺伝子が、薬剤耐性遺伝子の変異遺伝子である請求項1のDNA複製モデル。

【請求項3】 組換え体プラスミドを導入する宿主菌が、DNAポリメラーゼIII ε因子に変異を有する大腸菌KH1380のrecA⁻株であるKH1379(dnaQ49)である請求項1または2のDNA複製モデル。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、大腸菌におけるDNA複製モデルに関するものである。さらに詳しくは、この発明は、ゲノムDNAの不連続(lagging)複製と連続(leading)複製とでは変異の発生頻度が異なるか否か、もし異なるとすればどの程度の違いが存在するかを生物的に証明することのできるDNA複製モデルに関するものである。

【0002】

【従来の技術とその課題】生物の多様な進化は、その構造や機能をコードする遺伝子DNAの突然変異によってもたらされている。従来、このような突然変異は、2本鎖DNAの分裂・複製時に、各々の鎖に同じ割合で生じると考えられてきた。ところが、2本のDNA鎖に突然変異が均等に生じるとすると、最初のDNA配列をそのまま継承する子孫が途中で消失してしまう。環境に変化がない時には同じ形質の生物が生き残るはずであるが、この変異均等説では説明に矛盾が生じる。

【0003】これに対して、この発明の発明者等は、2本鎖DNAの分裂・複製時における突然変異の発生率は2本の新生鎖間で不均衡であり、一方が親鎖のDNA配列をほぼそのまま継承し、他方により多くの変異が蓄積されるとする「変異不均衡説」を提唱している。この説に従えば、環境に変化がない時にはDNA変異の少ない遺伝情報を受け継いだ個体が生き残り、一方、環境の変動に対してはより適応的な変異を持つ個体が選択されて進化が生じることになる。事実、この発明の発明者等は、この考えに基づいて突然変異がどのように生じるかをコンピュータシミュレーションしたところ、遺伝子が分裂・複製を繰り返しながら世代を経ていくうちに、従来の定説よりもはるかに多様な遺伝子を残せることを確認している。また、分裂・複製時に一方の新生鎖に生じる変異が他方よりも100倍以上多ければ、最初のDNA配列と同じ配列がいつまでも継承され続けることを確

認してもいる(J. Theor. Bio., 157, p127, 1992)。

【0004】さらにまた、この変異不均衡説は、ゲノムDNAの複製機構によってもその信憑性が見事に裏付けられている。すなわち、平行2本鎖からなる遺伝子DNAは塩基の相補性を利用して複製を行うが、両方の親鎖をそれぞれ鋳型とする2本の新生鎖の合成は、触媒する酵素の特性により5'→3'の一方向に限られる。ところが、親鎖である2本鎖DNAの分裂は任意の起点から始まり、一方向に開列が進行するため、開列の進む方向と合成の方向が一致する新生鎖は簡単な酵素等で触媒されて切れ目なく連続的に合成されるが、開列方向と合成方向が逆になる新生鎖は、岡崎フラグメントを一つ一つ連結しながら不連続的に合成されることになる。当然のことながら、連続的な合成に比べて、不連続な合成にはより複雑な機構が介在することになり、塩基の相補性に誤りが発生する確率が高くなることは容易に想像される。

【0005】このように、変異不均衡説は、従来の理論では説明できなかった生物の多様な進化の形態を極めて合理的に説明することができ、しかもゲノムDNAの複製機構の面からも充分な根拠を有する優れた理論であると評価されている。しかしながら、これまでのところ、分裂・複製後のDNA変異が、連続鎖(leading鎖)よりも不連続鎖(lagging鎖)で多く生じていることを生物系で実証した例はない。もしこの説が生物学的に証明されれば、その不均衡な変異発生率を人為的に制御することも可能となり、それによって、生物の進化の速度を急速に速めて有益な生物個体を効率的に創出しようとする進化工学に新たな途を拓くことができるものと期待される。

【0006】この発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、ゲノムDNAの不連続(lagging)複製と連続(leading)複製とにおける変異発生頻度の不均衡性を実証的に示すことのできるモデル系を提供することを目的としている。

【0007】

【課題を解決するための手段】この発明は、上記の課題を解決するものとして、DNA複製が複製起点から一方向に進行するプラスミドにレポーター遺伝子を接続した組換え体プラスミドを、ミスマッチ塩基の校正因子を欠く宿主菌に導入し、組換え体プラスミドの2本鎖DNAの各々の複製時に生じるレポーター遺伝子の変異発生率の差を、宿主菌の形質の相違として検出することを特徴とする大腸菌におけるDNA複製モデルを提供する。

【0008】以下、この発明の構成と、その好ましい態様について説明する。この発明のDNA複製モデルでは、DNA複製が複製起点から一方向に進行するプラスミドにレポーター遺伝子を接続した組換え体プラスミドを一つの構成要件とする。すなわち、プラスミドは相補的な2本鎖の環状DNAであり、その分裂・複製が1箇

所の複製起点から一方向に進行すれば、例えば内側のDNA鎖は5'→3'方向に連続的な娘鎖(leading鎖)を合成するが、外側のDNA鎖から合成される娘鎖は3'→5'方向の不連続鎖(lagging鎖)となる。そこで、このようなプラスミドに、レポーター遺伝子として、例えば薬剤耐性へと変異しうる薬剤感受性遺伝子を接続して組換え体プラスミドを作成する。その際に、遺伝子のmRNAがleading鎖から転写される組換え体プラスミドと、lagging鎖から転写される組換え体プラスミドとを作成し、それぞれを大腸菌に導入して薬剤耐性菌の出現率の差をとれば、leading合成とlagging合成における変異発生頻度の違いを検出することができる。すなわち、変異不均衡説が正しければ、lagging鎖により多くの変異が生じ、その結果としてlagging鎖からmRNAを転写する組換えプラスミドを導入した大腸菌がより多く薬剤耐性へと変異すると考えられる。

【0009】あるいはまた、2種類の薬剤感受性遺伝子をプラスミドに接続して、一方をleading鎖から転写させ、他方をlagging鎖から転写させるようにしてもよい。この場合に、leading鎖から転写される遺伝子よりもlagging鎖から転写される遺伝子の変異率が高いとすれば、大腸菌は一方の薬剤にのみ耐性を示すようになると考えられる。

【0010】さらに、この発明のDNA複製モデルでは、上記の組換え体プラスミドを、ミスマッチ塩基の校正因子に変異を有する宿主菌に導入して変異を誘導することを構成要件としてもいい。このような変異菌としては、DNAポリメラーゼIII ε因子に変異を有する大腸菌KH1379(dnaQ49)を例示することができる。すなわち、様々な生物種において一回のDNA複製で塩基のミスマッチが生じる確率は1塩基対当たり10⁻¹⁰以下であると思われていたが、dnaQ49株ではこの確率が10⁻⁸から10⁻⁵倍も増加する。従って、このdnaQ49株において上記の組換え体プラスミドを分裂・複製させることによって、leading合成とlagging合成における変異発生頻度の違いをさらに明瞭なものとすることができる。

【0011】以下、実施例として、この発明のDNA複製モデルの具体例と、その試験結果について詳細に説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。

【0012】

【実施例】プラスミドpBR322のColE1型複製起点と2種類の薬剤感受性遺伝子(クロラムフェニコール感受性遺伝子:Cm^r、テトラサイクリン感受性遺伝子:Tc^r)を有する組換え体プラスミドpTCS-Kを、図1の工程に従って作成した。この組換え体pTCS-Kは、pTWS011から切り出したCm^rを含む1334bpのDNA断片およびTc^rを含む1375bpの断片を、pBR322のアンピシリン耐性遺伝子(A

p^r)と複製起点(ori)を含む断片(2992bp)に接続したものである。

【0013】なお、Cm^rを含む断片については、その接続方向を変え、図2(A)に示したpTCS-K19群(K-19、K-2、K-47、K-31)と、図2(B)に示したpTCS-K20群(K-20、K-1、K-44、K-34)を作成した。すなわち、この組換え体pTCS-Kは、複製によって内側のDNA鎖がlagging合成され、外側がleading合成される。従って、Cm^r断片の接合方向が逆転することにより、pTCS-K19群はlagging鎖からCm^rを転写し、一方、pTCS-K20群はleading鎖からCm^rを転写する。なお、Tc^rはいずれの場合もleading鎖から転写される。

【0014】このようにして作成したpTCS-Kを、大腸菌KH1380(dnaQ49)のrecA⁺株であるKH1379(dnaQ49)に導入し、アンピシリン含有LB培地において24℃で16時間培養した。次いで、37℃でさらに16時間培養してdnaQ49の変異を誘導した。上記の各温度での培養ののち、アンピシリン単独またはアンピシリンとクロラムフェニコールを含有するLB培地での生存菌の数を計測し、アンピシリン耐性菌に対するクロラムフェニコール耐性菌の割合としてCm^r→Cm^s変異率を算出した。

【0015】結果は、表1に示したとおりであり、クロラムフェニコールに対する感受性(Cm^s)から耐性(Cm^r)への変異はlagging鎖側に遺伝子をコードするpTCS-K19群による形質転換菌のほうがleading鎖側にコードするpTCS-K20群によるそれよりも約10倍も多いことが確認された。また、pTCS-K19群とpTCS-K20群の変異発生率の差は、dnaQ49の変異を誘導(37℃培養)することによってさらに明瞭となった。

【0016】

【表1】

| プラスミド | 複製と発現 の方向 | Cm耐性への 変異率 ($\times 10^{-4}$) | |
|----------|--------------|------------------------------------|------|
| | | 24°C | 37°C |
| | Ori Cm | | |
| pTCS-K20 | | 3 | 94 |
| pTCS-K1 | → ← | 8 | 60 |
| pTCS-X44 | | 7 | 110 |
| pTCS-K34 | | 8 | 83 |
| pTCS-K19 | | 45 | 1100 |
| pTCS-K2 | → → | 55 | 1200 |
| pTCS-K47 | | 21 | 1300 |
| pTCS-K31 | | 37 | 800 |

*【0017】次に、pTCS-K19とpTCS-K20とをそれぞれ導入したKH1379の形質転換体を、アンピシリン含有LB培地において24°Cで5時間培養したのち、37°Cの培養条件に移し、dnaQ49の変異を誘導してCm^r への変異菌を計測した。計測は、クロラムフェニコールおよびアンピシリン含有LB培地上で熱誘導から1時間毎に、OD₅₅₀の吸光度を測定することによって行った。

【0018】結果は、表2に示したとおりであり、pTCS-K19とpTCS-K20の各々の形質転換菌における変異菌発生率の差は、熱による変異誘導の時間増加に伴って大きくなり、6時間以降からは8倍以上にもなった。

【0019】

【表2】

*20

| 37°Cでの 培養時間 | OD ₅₅₀ | | Cm耐性への変異率 ($\times 10^{-4}$) | | |
|----------------|-------------------|------|--------------------------------|-------------|-------------|
| | K19 | K20 | K19 | K20 | 比率(K19/K20) |
| 0 | 0.34 | 0.33 | — | — | — |
| 1.0 | 1.70 | 1.68 | 40.0 ± 13.6 | 18.9 ± 4.4 | 2.1 |
| 2.0 | 2.70 | 2.65 | 118.3 ± 57.0 | 44.7 ± 5.2 | 2.6 |
| 3.0 | 3.90 | 4.00 | 249.1 ± 23.5 | 77.8 ± 60.2 | 3.2 |
| 4.0 | 4.60 | 4.50 | 271.1 ± 16.8 | 80.0 ± 44.0 | 3.4 |
| 5.0 | 5.20 | 5.30 | 256.5 ± 92.1 | 40.6 ± 29.8 | 6.3 |
| 6.0 | 5.60 | 5.50 | 174.1 ± 29.5 | 21.6 ± 1.3 | 8.1 |
| 7.5 | 6.90 | 6.70 | 70.7 ± 8.4 | 8.3 ± 2.4 | 8.5 |
| 9.5 | 7.20 | 7.20 | 67.1 ± 2.6 | 8.1 ± 0.3 | 8.3 |

【0020】以上の結果から、複製時に leading合成されるDNA鎖に比べ、lagging合成されるDNA鎖では、遙に高い割合で遺伝子DNAの変異が発生することが確認された。

【0021】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この発明のDNA複製モデルにより、ゲノムDNAの分裂・複製時における突然変異発生率が、連続 (leading) 合成と不連続 (lagging) 合成とで異なるという変異不均衡説が生物系において証明される。これによって、進化工学に

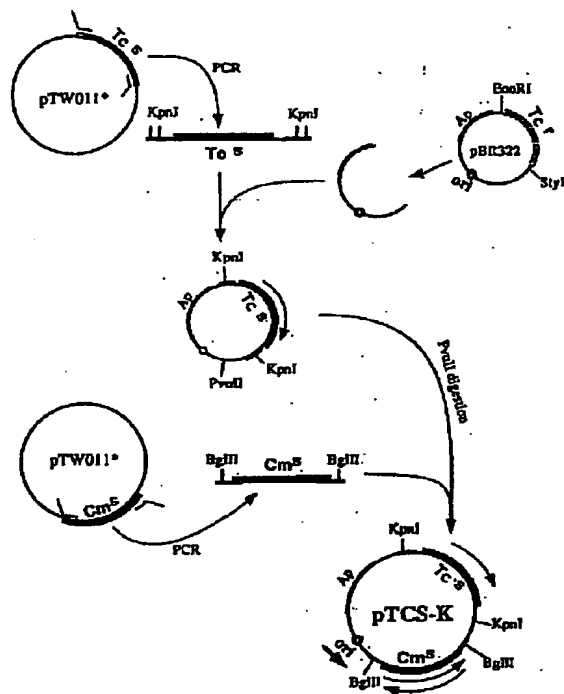
新たな可能性が拓かれる。また、このDNA複製モデルの構成を利用して、レポーター遺伝子の代わりに有用遺伝子を接続すれば、その変異配列を効率良く得ることが可能となる。

【図面の簡単な説明】

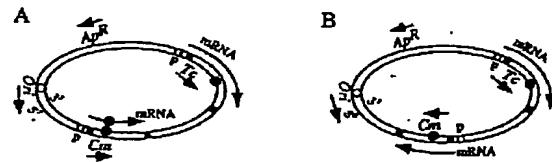
【図1】この発明のDNA複製モデルに用いる組換え体プラスミドの作成工程を示した模式図である。

【図2】Aは組換え体プラスミドpTCS-K19の構造図であり、BはpTCS-K20の構造図である。

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

| (51)Int.Cl. ⁶ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|--------------------------|------|---------|---------------------------|--------|
| // C 1 2 N 1/21 | | 8828-4B | | |
| (C 1 2 N 15/09 | | | | |
| C 1 2 R 1:19) | | | | |
| (C 1 2 Q 1/68 | Z | | | |
| C 1 2 R 1:19) | | | | |
| (C 1 2 N 1/21 | | | | |
| C 1 2 R 1:19) | | | | |
| | | | C 1 2 R 1:19) | |
| (71)出願人 592102906 | | | (72)発明者 石野 良純 | |
| 古沢 満 | | | 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造 | |
| 東京都江戸川区西葛西 6 - 6 - 8 西葛西 | | | 株式会社内 | |
| パークファミリア 605 | | | (72)発明者 古沢 満 | |
| (71)出願人 000005223 | | | 東京都江戸川区西葛西 6 - 6 - 8 西葛西 | |
| 富士通株式会社 | | | パークファミリア 605 | |
| 神奈川県川崎市中原区上小田中 4 丁目 1 番 | | | (72)発明者 土居 洋文 | |
| 1 号 | | | 神奈川県川崎市中原区上小田中 1015 富士 | |
| (72)発明者 今本 文男 | | | 通株式会社内 | |
| 大阪府吹田市古江台 1 丁目 9 の 3 | | | | |